Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

Über Wirkkomponenten und Wirkungsmechanismus von Insektengiften (nach Untersuchungen am isolierten Meerschweinchen- und Mäusedünndarm).

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

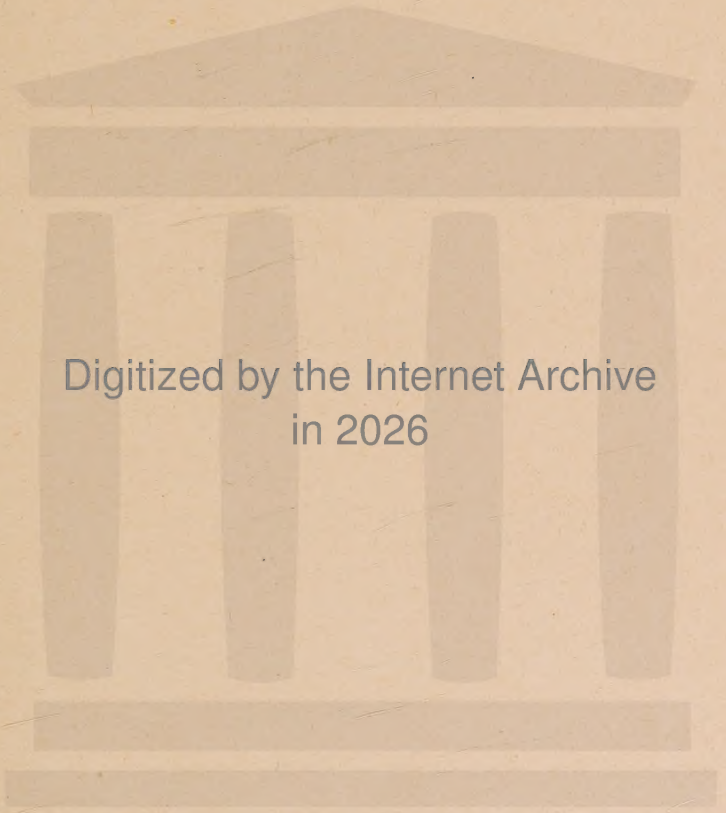
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Felix Albl
aus Rossbach

Würzburg 1956


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0003

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

Über
Wirkkomponenten und Wirkungsmechanismus von Insektengiften
(nach Untersuchungen am isolierten Meerschweinchen- und Mäusedünndarm).

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Felix Albl
aus Rossbach

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
13. Juni 1956

Referent: Privatdozent Dr. E. Habermann
Korreferent: Professor Dr. Dr. W. Neumann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

M E I N E N E L T E R N

Inhaltsübersicht

		Seite:
I.	Einleitung	1
II.	Eigene Versuche	2
	A. Methodik	2
	B. Versuche mit Bienengift	4
	1. Bienenpikratgift und Fraktion I	4
	2. Avil und Fraktion I	5
	3. Atropin und Fraktion I	6
	4. Thrombocid und gereinigtes Bienengift	7
	5. Papaverin und gereinigtes Bienengift	8
	6. Novocain und Fraktion I	9
	7. Vergleich mit Lysocithin	9
	C. Versuche mit Hornissengift	10
	1. Wirkung am Meerschweinchendarm	10
	2. Beeinflußbarkeit durch Atropin und Avil	11
	3. Wirkung am Mäusedarm	12
	4. Stabilität gegen Säure und Lauge	13
	5. Inaktivierung durch Cholinesterase	16
	6. Wirkung am atropinisierten Mäusedarm	17
	D. Versuche mit Wespengift	18
III.	Besprechung	19
IV.	Zusammenfassung	22
V.	Literatur	24

Über die Wirkungen von Insektengiften auf die glatte Muskulatur liegen bereits eine größere Anzahl von Untersuchungen vor.

Bienengift wurde erstmals von ESSEX, MARKOWITZ und MANN in dieser Hinsicht an Uterus und Bronchialmuskulatur geprüft. Eine teilweise Klärung des Problems wurde aber erst durch Arbeiten von TETSCH und WOLFF sowie von REINERT und von RICHTER erreicht. Alle Untersucher stimmten darin überein, daß Bienengift zwei darmwirksame Komponenten enthielt, von denen die eine sich chemisch und biologisch histaminartig verhielt, die andere aber ein langsameres Einsetzen der Kontraktion verusachte, Tachyphylaxie erzeugte und keiner der bisher bekannten Substanzen entsprach.

TETSCH und WOLFF sowie RICHTER wiesen auf die Ähnlichkeit der Wirkungsbilder des zweiten Prinzips und des Klapperschlangengiftes hin.

Nach FELDBERG und KELLAWAY spielt Histamin bei der Vergiftung durch Bienengift eine doppelte Rolle: einerseits ist es bereits im Giftsekret selbst enthalten, andererseits wird es aus tierischen Organen durch das Gift freigesetzt.

Auch am hiesigen Institut wurden Versuchsreihen mit Bienengift durchgeführt. So beobachtete SARTORIUS, daß die Wirkung von Bienengesamtgift im Gegensatz zu der von Histamin nicht durch Avil, im Gegensatz zu der von Azetylcholin nicht durch Atropin aufhebbar war. Auch die im Bienengift enthaltene Phospholipase A machten seine Experimente als Ursache nicht sehr wahrscheinlich; denn ihr Reaktionsprodukt Lysocithin setzte den Tonus des normalen oder unter Histamin stehenden Darmes herab. Im Rahmen ausgedehnter Untersuchungen über die Zusammensetzung von Bienengift wurden die von NEUMANN, HABERMANN und AMEND sowie NEUMANN und HABERMANN erhaltenen elektrophoretischen Fraktionen auch am Darm getestet. Hierbei war stets Fraktion I, welche auch die anderen pharmakologischen Effekte im engeren Sinn verursachte, sehr viel stärker wirksam als Fraktion II. Da vermutet wurde, daß Fraktion I mit der tachyphylaktisch wirkenden, langsame Kontraktion erzeugenden Substanz identisch sei, sollte in der vorliegenden Arbeit der nähere Mechanismus der Wirkung von Fraktion I im Vergleich zu gereinigtem Bienengift geprüft werden.

Wespengift wurde von SCHMITT am isolierten Meerschweinchendarm mit Bienengift verglichen. Dabei erwies sich das Gift der Wespe rund doppelt so wirksam als das der Biene; doch wurde Tachyphylaxie im Gegensatz zu Bienengift nicht beobachtet. Auch Wespengift ließ sich in seiner Darmwirksamkeit weder durch Avil, noch durch Atropin beeinflussen.

Englische Autoren (JAQUES und SCHACHTER, SCHACHTER und THAIN) unterschieden drei darmwirksame Komponenten im Wespengift. Neben der histaminartigen Wirkung fanden sie eine Substanz, welche sie Kinin nannten und die eine langsame, verzögerte Kontraktion hervorrief ("slow reacting substance"). 5-Oxytryptamin ließ sich am Darm erst in einer auf chromatographischem Wege gewonnenen Fraktion nachweisen.

Mit Hornissengift wurden in letzter Zeit Versuche am pharmakologischen Institut in Würzburg durchgeführt. Es wurden dabei papierchromatographisch und papierelektrophoretisch neben eiweißartigen Substanzen mindestens 3 Verbindungen gefunden, welche darmwirksam sein konnten: Histamin, ein Cholinester und 5-Oxytryptamin (HABERMANN[1]). ABRAHAMS konnte am Froschherzen und Froschrectus das Vorliegen von Azetylcholin mindestens sehr wahrscheinlich machen. Unsere eigenen Versuche sollten der weiteren Klärung dieser Frage dienen.

II. Eigene Versuche.

A. Methodik

Die Untersuchungen wurden am isolierten Meerschweinchen- und Mäusedünndarm durchgeführt. Da nur der kotfreie Darm eine möglichst gute und gleichmäßige Peristaltik gewährleistet, wurden die Tiere 24 Stunden nüchtern gesetzt und durch Nackenschlag getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde der Dünndarm von der Ileo-Coecal-Klappe aus bis zum Duodenum vom Mesenterium freipräpariert und abgeschnitten, der Inhalt wurde vorsichtig ausgestrichen. Eine Dehnung des Darmes wurde sorgfältig vermieden. Gleich in Tyrodelösung gebracht, konnte der Darm noch nach mehreren Stunden verwendet werden. Ein ungefähr 2 cm langes Darmstückchen wurde von noch zurückgebliebenem Mesenteri-

um befreit und mit Bindfäden in einem mit Tyrodelösung gefüllten Gefäß fixiert (nähere Beschreibung der Apparatur bei HABERMANN[2]). Um möglichst geringe Substanzmengen testen zu können, wurde ein schmales, nur 10 ccm Flüssigkeit fassendes Darmgefäß benützt. Die zu prüfenden Lösungen wurden mit einer Tuberkulinspritze gleichmäßig langsam und immer gleich weit von dem Darm entfernt in das Tyrodebad eingebracht. Die Temperatur des Thermostaten wurde auf 39,0° gehalten.

Bei dieser Anordnung wurden hauptsächlich die Kontraktionen der Längsmuskulatur des Darmes auf den Schreibhebel übertragen. Da das Darmstück an beiden Seiten abgebunden war, erreichten die Pharmaka nur von der Serosa aus die erregbaren Gewebselemente.

Als Nährlösung wurde Tyrodelösung für Warmblüter nach VON MURALT verwendet. In einem Liter Wasser waren enthalten:

8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g $CaCl_2$ 0,1 g $MgCl_2$
1,0 g $NaHCO_3$ 0,05 g NaH_2PO_4 1,0 g Traubenzucker.

Täglich wurden die Lösungen frisch hergestellt, und zwar aus 2 Stammlösungen:

Lösung I		Lösung II
20 % NaCl	0,5 % $CaCl_2$	5,0 % $NaHCO_3$
0,5 % KCl	0,25 % $MgCl_2$	0,25 % NaH_2PO_4

80 ccm der Lösung I und 40 ccm der Lösung II verdünnte man auf je einen Liter Wasser, goß beide nach Zusatz von 2 g Traubenzucker unter Umschütteln zusammen; der pH-Wert dieser gepufferten Lösung lag zwischen 7,2 und 7,4 und wurde mit Spezialindikatorpapier Merck jeweils kontrolliert.

Die verwendeten Substanzen waren:

Bienengift:
als "Pikratgift 52" der Fa. H. Mack Nachf. Illertissen (nach den Vorschriften von TETSCH und WOLFF über das Pikrat gereinigt)
als "Nativgift": getrocknetes natives Bienengift (im Herbst 1952 von HABERMANN gewonnen)
Fraktion I: chromatographisch nach F.G.FISCHER und W.P.NEUMANN aus Bienenpikratgift gewonnen.

Wespen- und Hornissengift: als getrocknetes Nativgift (ABRAHAMS)

Lysocithin: nach der Methode von MAGISTRIS von HABERMANN[1] hergestellt und chromatographisch gereinigt
Cholinesterase: hämolysierte Erythrozytenaufschwemmung
Thrombocid: "Benend"
Acetylcholin: "Roche"
Histamindihydrochlorid: "Roche"
Avil: "Hoechst" (p-aminosalicylsaures Salz des 1-Phenyl-1-pyridyl-(2')-3-dimethylaminopropans)

B. Versuche mit Bienengift

1. Bienenpikratgift und Fraktion I am Meerschweinchendarm

Bei vergleichenden Versuchen mit frischem und getrocknetem Nativbienengift war die Darmempfindlichkeit gegenüber Frischgift bei wiederholter Gabe besonders stark abgeschwächt (SARTORIUS).

Am spontan schlagenden Froschherzen ergaben nach ABRAHAMS getrocknetes Nativgift, Pikratgift und Fraktion I in ihrer Wirkung keine qualitativen Unterschiede, Tachyphylaxie war nicht eindeutig nachweisbar.

SALZMANN hatte bei der Katze festgestellt, daß Pikratgift stärker blutdrucksenkend wirkt als Fraktion I.

Bei unseren Versuchen wurden Pikratgift 52 und die chromatographisch gewonnene Fraktion I alternierend in gleicher Menge gegeben (vgl. Abb.1).

Pikratgift ergab zunächst einen wesentlich höheren Ausschlag als Fraktion I. Beide Präparate wirkten tachyphylaktisch. Die Tachyphylaxie gegen Pikratgift war, wie die Abbildung zeigt, stärker, sodaß sich im Laufe des Versuchs die Reaktion auf Pikratgift und Fraktion I immer mehr anglich. Es ist also anzunehmen, daß im Bienenpikratgift (welches nach SALZMANN praktisch kein Histamin mehr enthält) zwei darmwirksame Komponenten enthalten sind, Fraktion I und eine zweite, stark Tachyphylaxie erzeugende Substanz.

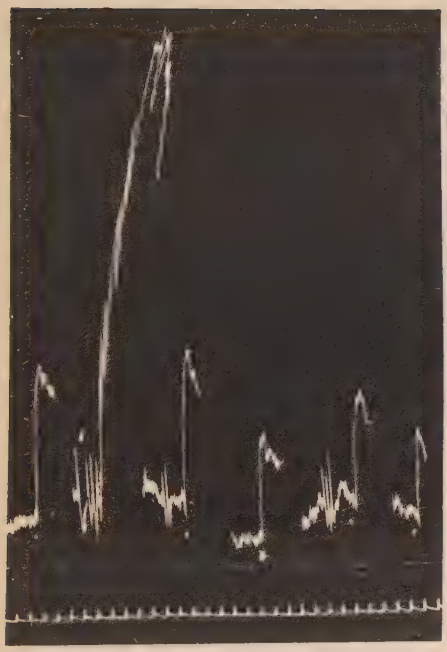


Abb.1:
Bienenpikratgift und
Fraktion I alternierend
am Meerschweinchendarm

1 = 1γ Fraktion I
2 = 1γ Bienenpikratgift,
dazwischen Spülung

Zeitschreibung für alle
Abbildungen: 30 Sekunden

2. Avil und Fraktion I

Eine histaminartige Wirkung des Bienengiftes ist schon lange bekannt. ACKERMANN und MAUER stellten fest, daß das Antihistaminikum Antergan in hohen Dosen die Bienengiftkontraktion des Darmes aufhebt, daß aber die Wirkung des Giftes nicht allein auf Histamin zurückzuführen ist. Ähnliche Resultate erzielte SARTORIUS mit dem Antihistaminikum Avil der Farbwerke Hoechst, das auch bei unseren Versuchen benutzt wurde. Daß Avil den blutdrucksenkenden Effekt von Fraktion I an der Katze nicht zu hemmen vermag, hat SALZMANN beschrieben.

Wir ließen 10γ Fraktion I 10 Minuten auf den Darm einwirken und gaben dann 0,25γ Avil dreimal hintereinander in Abständen von 4 Minuten. Ein sofortiger Abfall trat nicht ein. Der Verlauf der Kurve nach

gleichen Avilgaben bei einer Kontraktion durch 0,05γ Azetylcholin war entsprechend, während bereits eine einmalige Avilgabe den durch 0,1γ Histamin erhöhten Darmtonus sofort auf die Ausgangslage zurückbrachte. Höhere Avilmengen (5γ) ergaben eine partielle Hemmung gegenüber Fraktion I, aber auch gegenüber Azetylcholin; daher kann die Hemmung durch höhere Avildosen nicht als spezifisch angesehen werden.

Abb.2 : Avil und Fraktion I
1 = 10γ Fraktion I
2 = 0,25γ Avil
3 = 0,05γ Azetylcholin
4 = 0,1γ Histamin

3. Atropin und Fraktion I

Die Darmwirkung des Azetylcholins wird bekanntlich durch Atropin aufgehoben. ACKERMANN und MAUER berichten schon, daß der atropinisierte Meerschweinchendarm noch die übliche Kontraktion auf Trockenbienengift ausführte. Auch SARTORIUS hatte festgestellt, daß sich die durch Bienengift hervorgerufene Kontraktion des isolierten Meerschweinchendünndarmes durch Atropin nicht wesentlich beeinflussen läßt. Atropin konnte auch nicht die Wirkung von Fraktion I am Blutdruck der Katze aufheben (SALZMANN).

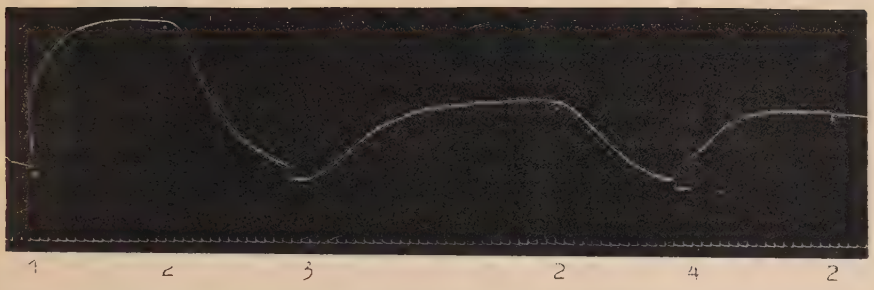


Abb.3: Fraktion I und Atropin
1 = 0,5γ Azetylcholin
2 = 0,025γ Atropin
3 = 0,5γ Fraktion I
4 = 0,5γ Histamin

Bei unseren Versuchen wurden die durch 0,5γ Fraktion I bewirkten Ausschläge durch geringe Atropindosen (0,025γ) abgeschwächt. War der Ausschlag von vorneherein niedrig, konnte er auch total aufgehoben werden. Fraktion I verhielt sich in dieser Hinsicht wie Azetylcholin (0,5γ), nicht aber wie Histamin. Höhere Dosen von Fraktion I (100γ) wurden allerdings durch Atropin nicht gelähmt. Selbst bei einer Atropinmenge von 100γ war kein steilerer Abfall der Kurve zu beobachten.

4. Thrombocid und Bienenpikratgift

HABERMANN (3) stellte fest, daß Heparin und Thrombocid vorwiegend Fraktion I inaktivieren. Thrombocid vermag nach SCHLÖGL alle von ihm untersuchten pharmakologischen Wirkungen des Bienengiftes (direkte Hämolyse, Muskelwirksamkeit, örtliche Schmerz- und Entzündungsauslösung am Kaninchenauge) stark zu hemmen. Versuche am Meerschweinchendarm mit Bienengift (100γ), welches mit der gleichen Menge Thrombocid versetzt war, ließen jedoch, ebenso wie solche mit direkter und indirekter Reizung des quergestreiften Froschmuskels, noch einen Rest an Bienengiftaktivität erkennen.

Bei unseren Versuchen zeigte Thrombocid für sich allein keine Wirkung auf den Darm. Wurde es nachträglich nach ungefähr 10 Mi-

nuten selbst in einer Menge von 1000γ gegeben, so bewirkte es nur einen geringen stufenförmigen Abfall sowohl der durch 1γ Pikratgift als auch der durch 0,1γ Histamin hervorgerufenen Kontraktion.

Wurden 10γ Pikratgift zunächst in Tyrode mit dem gleichen Volumen Tyrodelösung mit 100γ Thrombocid gemischt und dann zu dem Darmstück gegeben, so bestanden gegenüber dem Kontrollversuch - Tyrode mit Pikratgift - keine verwertbaren Unterschiede. Bei abwechselnder Einwirkung beider Lösungen konnte nur ein gleichmäßiger Abfall in der Höhe der Ausschläge beobachtet werden (Tachyphylaxie).

5. Papaverin und Bienengift

Um die muskulotrope Wirkung des Bienengiftes zu prüfen, wurde das Spasmolytikum Papaverin benützt (SCHAUMANN). Zuerst wurde die Papaverinmenge festgestellt, die die muskulotrope Wirkung von 250γ Bariumchlorid kompensiert; 50γ Papaverin führte einen prompten Abfall der Kurve herbei.

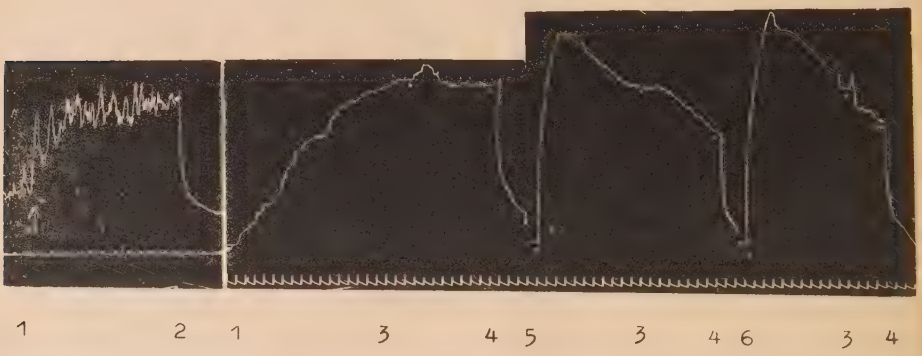


Abb. 4: Fraktion I, Papaverin und Novocain
1 = 10γ Fraktion I
2 = 50γ Papaverin
3 = 10γ Novocain
4 = 100γ Novocain
5 = 0,5γ Histamin
6 = 0,1γ Azetylcholin

Nach vorheriger Applikation von 0,5γ Pikratgift und auch bei höheren Dosen wurde durch 100γ Papaverin ein sofortiger Abfall der Kontraktion bis unter die Ausgangslage erreicht, wobei die normale Peristaltik längere Zeit nicht wieder auftrat. Wurde zuerst Papaverin gegeben, so war der gelähmte Darm selbst bei Applikation von 100γ Pikratgift nicht mehr kontraktionsfähig. Bei 10γ Fraktion I wurde der gleiche Effekt wie bei Bienenpikratgift erreicht.

6. Novocain und Fraktion I

Die Darmhemmung durch Novocain soll nach GREFF hauptsächlich parasympathicolytisch bedingt sein.

Durch 100γ Novocain wurde die durch 100γ Fraktion I hervorgerufene Tonuserhöhung sofort bis auf die Ausgangslage abgeschwächt. Vergleichsweise Versuche mit 0,1γ Azetylcholin und 0,5γ Histamin führten zu demselben Ergebnis. Während bei 10γ Novocain in keinem Falle eine Erschlaffung eintrat, war bei 100γ Novocain der sofortige Abfall vollständig. Novocain erscheint also zur Differenzierung des Angriffpunktes der drei Substanzen nicht brauchbar.

7. Vergleich mit Lysocithin

Das indirekt hämolysierende Prinzip von Bienen- und Schlangengift entspricht der Phospholipase A, die zugesetztes Lecithin unter Abspaltung einer Fettsäure in Lysocithin überführt. Da uns ein gut gereinigtes Lysocithin zur Verfügung stand, wurde es auf seine Darmwirksamkeit geprüft und diese mit den Ergebnissen von SARTORIUS verglichen.

Bei einer Menge von 500γ war bei unseren Versuchen anfangs jedes Mal eine zum Teil recht deutliche Kontraktion und anschließend eine stärkere Lähmung zu beobachten. Die nachfolgende Tonussenkung wurde auch schon von SARTORIUS beschrieben. Der starke, durch 0,025γ Azetylcholin erzeugte Ausschlag vor der Lysocithingabe konnte anschließend nach mehrmaligem Spülen nicht mehr hervorgerufen werden. Auch nach 20 Minuten und durch eine höhere Azetyl-

cholindosis (0,5γ) war keine Kontraktion zu erzielen. Dies entspricht den Ergebnissen von FELDBERG, HOLDEN und KELLAWAY mit Eigelb-Kobragift-Mischungen.

C. Versuche mit Hornissengift

1. Die Wirkung von Hornissengift am isolierten Meerschweinchendünndarm

Das bei unseren Versuchen benützte Hornissengift wurde von HABERMANN[1] und ABRAHAMS gewonnen:

Die in einem Kühlschrank abgekühlten Hornissen wurden mit dem Abdomen leicht auf die innere Wand eines mit 2-3 ccm aqua bidest. gefüllten Glasschälchens gedrückt, wobei die kristallklaren Gifttröpfchen austraten und mit aqua bidest. aufgenommen wurden ("Melken"). Die Lösung wurde gefriergetrocknet und das Trockengift in 0,85%iger Kochsalzlösung zu einer 1%igen Lösung suspendiert. Diese Stammlösung wurde in der Tiefkühltruhe bei -10°C aufbewahrt.

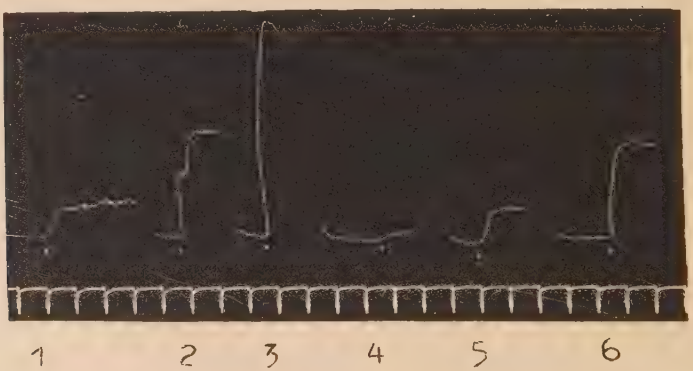


Abb.5: Hornissengift und Azetylcholin am Meerschweinchendarm
1 = 0,025γ, 2 = 0,05γ, 3 = 0,1γ Azetylcholin
4 = 0,25γ, 5 = 0,5γ, 6 = 1,0γ Hornissengift

Hornissengift war bis jetzt noch nicht am Meerschweinchendünndarm getestet worden. Die von HABERMANN[1] darin papierelektrophoretisch und papierchromatographisch gefundenen Komponenten sollten in ihrer Darmwirksamkeit geprüft und analysiert werden.

10 aufeinanderfolgende Applikationen von 0,5γ Hornissengift verursachten jeweils gleich große Ausschläge. Die hohe Aktivität sowie Kurvenform und Auswaschbarkeit ließen an Wirkungen einer niedermolekularen Substanz, wie Histamin oder Azetylcholin denken. Wurde Histamin vor und nach dem Versuch gegeben, so zeigte sich, daß durch das Hornissengift keine Verminderung der Darmerregbarkeit eingetreten war. Hornissengift war- das Verhältnis schwankte von Fall zu Fall etwas- 2 - 5 mal weniger aktiv als Histamin und 20 mal schwächer als Azetylcholin (vgl. Abb.5).

2. Beeinflußbarkeit durch Atropin und Avil

HABERMANN[1] hatte Histamin durch Papierelektrophorese und -chromatographie im Hornissengift nachgewiesen, pharmakologisch auch am Blutdruck der Katze. Es war nun zu prüfen, inwieweit sich die darmerregende Wirkung des Hornissengiftes durch das Antihistaminpräparat Avil (Farbwerke Hoechst) aufheben ließ.

Um eine Azetylcholinwirkung des Hornissengiftes auszuschließen, wurde die Vorratslösung an Tyrode mit Atropin versetzt (Endkonzentration 5γ/ccm). 1γ Azetylcholin, das am nicht atropinisierten Meerschweinchendarm ungefähr 10 mal wirksamer als Histamin war (das Verhältnis schwankte allerdings stark von Darm zu Darm) erzeugte bei der angewandten Atropindosierung eine kaum wahrnehmbare Darmerregung. Am atropinisierten Meerschweinchendarm wurden ungefähr gleich hohe Kontraktionen durch 10γ Hornissengift und 0,05 - 0,1γ Histamin hervorgerufen. Hieraus wäre auf einen Histamingehalt von maximal 1% im Hornissengift zu schließen. Es war aber die Frage, ob es sich wirklich nur um Histamin handelte. Dies sollte durch zusätzliche Behandlung mit dem Antihistaminikum Avil entschieden werden.

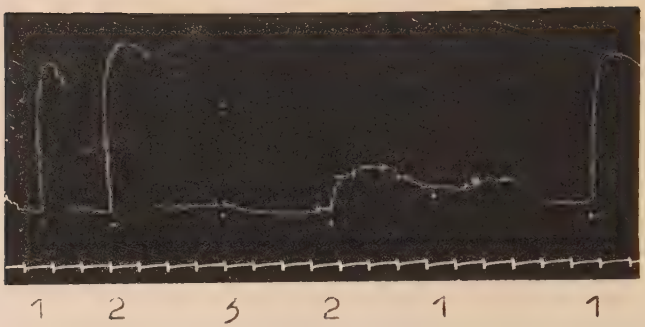


Abb.6 Hornissengift und Avil am atropinisierten Meerschweinchendarm
1 = 0,05 γ Histamin
2 = 10 γ Hornissengift
3 = 1 γ Avil
Atropin: 5 γ /ccm

Um eine spasmolytische Wirkung zu verhindern, wurde Avil in niedrigen Konzentrationen gegeben, die eine Histaminwirkung nicht ganz unterdrückten. Abb.6 zeigt, daß nach 2 Minuten langer Einwirkung von 1 γ Avil 0,05 γ Histamin nur noch eine kaum wahrnehmbare Kontraktion hervorruft, während unmittelbar zuvor gegebenes Hornissengift deutlich stärker wirkte. Auch wenn man umgekehrt nach Avil zuerst Histamin und dann erst Hornissengift appliziert, ist die Histaminhemmung stärker. Die "Restkontraktion" nach Atropinisierung ist also nicht allein durch Histamin bedingt.

3. Vergleich von Hornissengift und Azetylcholin am Mäusedarm

Um die Histaminwirkung des Hornissengiftes auszuschalten, wurde zur Ermittlung des auch nach den Versuchen von ABRAHAMS zu erwartenden Azetylcholins der gegen Histamin sehr wenig empfindliche Mäusedarm benutzt. Bereits 0,1 γ Azetylcholin riefen hier eine Kontraktion hervor, während Histamin ca. 500 mal schwächer wirkte.

Es wurde zuerst Azetylcholin in drei aufeinanderfolgenden steigenden Dosen gegeben, dann in derselben Anordnung Hornissengift

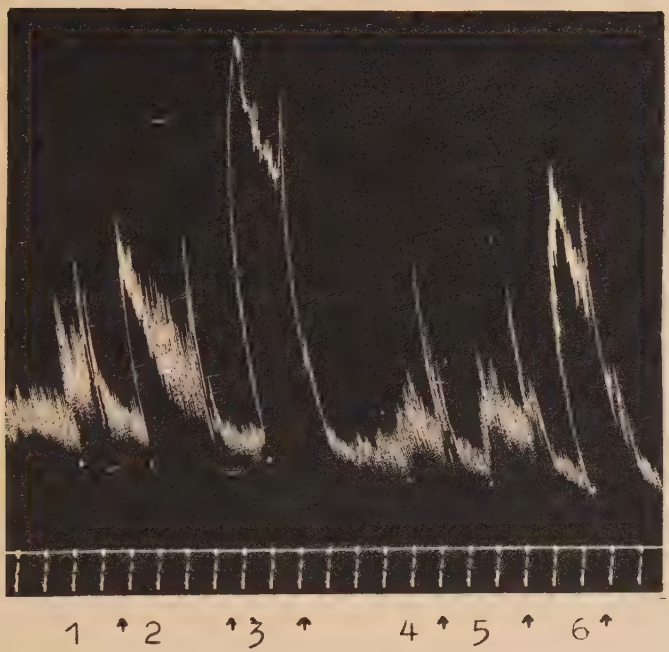


Abb.7: Vergleich von Hornissengift und Azetylcholin am Mäusedarm
1 = 0,05γ , 2 = 0,1γ , 3 = 0,5γ Azetylcholin
4 = 0,5 γ , 5 = 1,0γ , 6 = 5 γ Hornissengift
↑ = Spülung

in annähernd gleich wirksamen Dosen. Durch 5γ Hornissengift wird, wie Abb.7 zeigt, nicht ganz der gleiche Aussschlag erzielt wie durch 0,5γ Azetylcholin. Die Aktivität des von uns untersuchten Hornissengiftes entsprach demnach einem Azetylcholingehalt von ca. 5-10%. HABERMANN[1] fand auf photometrischem Wege ca. 8%, ABRAHAMS pharmakologisch am Froschherzen ca. 3-4% sich wie Azetylcholin verhaltende Substanzen.

4. Verhalten von Hornissengift gegen Säure und Lauge

Dieser Versuch sollte feststellen, inwieweit bei Vorbehandlung mit n/10 HCl und n/10 NaOH eine Abschwächung der Darmwirksamkeit

von Hornissengift eintritt. Von einer Hornissengift-Ausgangslösung von 100 γ /ccm wurde ein Teil mit dem gleichen Volumen n/10 HCl, ein zweiter Teil mit n/10 NaOH, ein dritter zur Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt und in einem Wasserbad 15 Minuten auf annähernd 100° erhitzt. Anschließend wurde neutralisiert und auf 1 γ /ccm bezw. 0,1 γ /ccm weiter verdünnt. Mit Azetylcholin wurde in gleicher Weise verfahren.

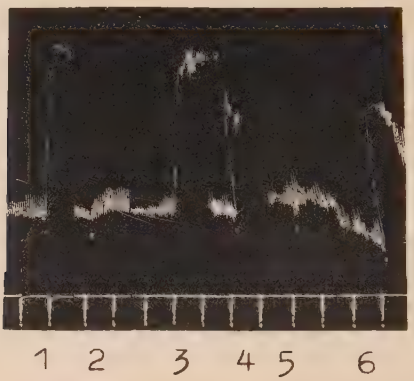


Abb.8: Hornissengift und Azetylcholin 15 Minuten nach Behandlung mit NaOH bei 100°.
1 = 0,1 γ Azetylcholin
2 = 0,1 γ Azetylcholin und NaOH nach 15 Minuten
3 = 0,1 γ Azetylcholin und NaCl-Lösung nach 15 Minuten
4 = 1 γ Hornissengift
5 = 1 γ Hornissengift und NaOH nach 15 Minuten
6 = 1 γ Hornissengift und NaCl-Lösung nach 15 Minuten

Abbildung 8 zeigt, daß sowohl bei Azetylcholin als auch bei Hornissengift durch Behandlung mit n/10 NaOH eine deutliche Herabsetzung der Darmwirksamkeit eintrat.

Die mit HCl und Kochsalzlösung behandelten Proben zeigten gegenüber dem Ausgangsmaterial keine wesentliche Aktivitätsveränderung am Mäusedarm.

Nun wurde die Resistenz von Hornissengift im Vergleich zu Azetylcholin bei längerer Einwirkung von n/10 HCl bei 100° geprüft. 1 ccm Azetylcholin $1:10^5$ und 1 ccm Hornissengift $1:10^3$ wurden jeweils mit 1 ccm n/10 HCl im siedenden Wasserbad erhitzt. Um ein Verdampfen zu verhindern, wurden die Reagensgläser mit 30 cm langen Glasröhrchen verlängert; als Verbindungsstücke dienten durchbohrte Gummistopfen. Nach 30, 60 und 120 Minuten wurden jeweils 0,4 ccm entnommen, in Eiswasser gestellt, mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,0 ccm ergänzt. So standen jeweils 2 ccm Hornissengiftlösung $1:10^4$ und 2 ccm Azetylcholin $1:10^6$ zur Weiterverdünnung, bezw. zur Testung zur Verfügung.

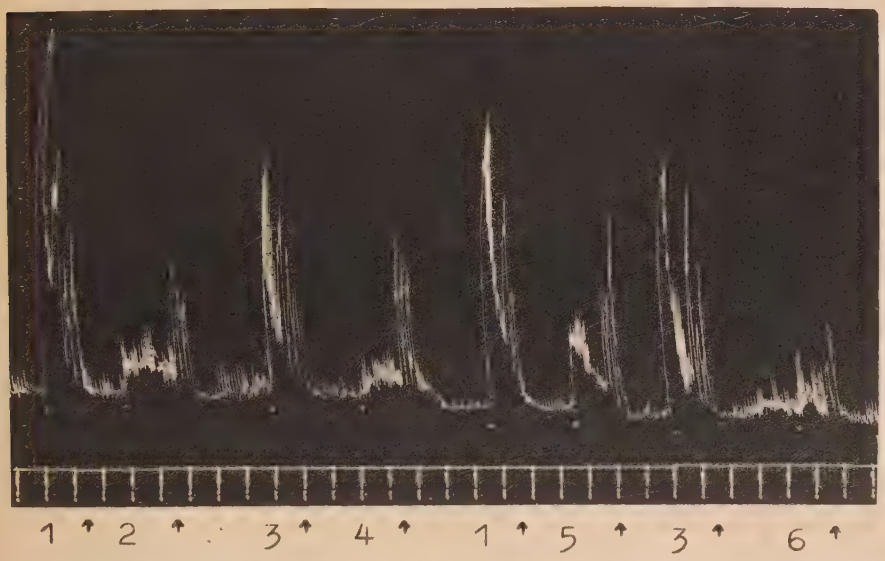


Abb.9: Hornissengift und Azetylcholin nach Behandlung mit HCl bei 100°

1 = 5γ Hornissengift
2 = 5 γ Hornissengift und HCl nach 120 Minuten
3 = 0,1 γ Azetylcholin
4 = 0,1 γ Azetylcholin und HCl nach 120 Minuten
5 = 5 γ Hornissengift und HCl nach 60 Minuten
6 = 0,1γ Azetylcholin und HCl nach 60 Minuten
↑ = Spülung

Nach 60 Minuten Erhitzen zeigte sich sowohl beim Azetylcholin als auch beim Hornissengift eine deutliche Verminderung der Darmwirksamkeit; Hornissengift war etwas stabiler. Nach 120 Minuten Erhitzen war durch beide kaum noch ein Effekt hervorzurufen.

5. Versuche mit Cholinesterase und Eserin

Zum Nachweis der Verwandtschaft des darmwirksamen Faktors des Hornissengiftes mit Azetylcholin wurde die Verseifung des Azetylcholins mit Cholinesterase verwendet, die aus einer Erythrozytenaufschwemmung gewonnen wurde. Die Erythrozyten wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit destilliertem Wasser hämolysiert, die Stromata in der hochtourigen Zentrifuge "Pirouette" abzentrifugiert und wieder in Kochsalzlösung suspendiert. Zur Hemmung der Cholinesterase wurde Eserin verwendet.

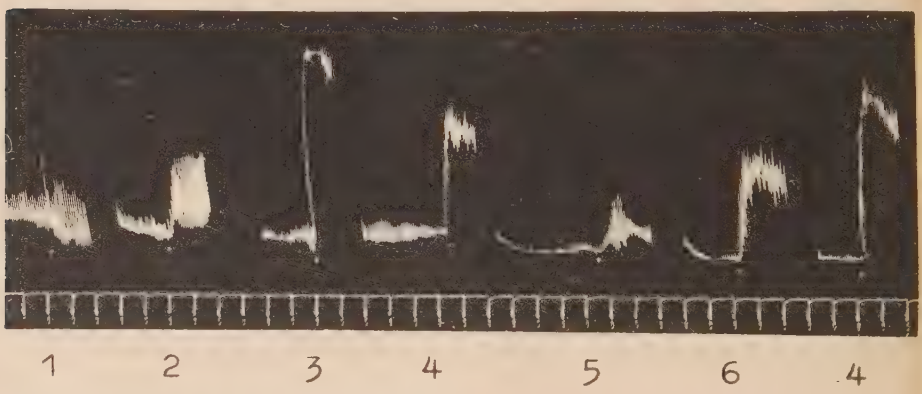


Abb.10: Verseifung durch Cholinesterase, die durch Eserin gehemmt wird
1 = 0,5 γ Azetylcholin und Cholinesterase nach 60 Minuten
2 = 0,5 γ Azetylcholin, Cholinesterase und Eserin nach 60 Min.
3 = 0,5 γ Azetylcholin
4 = 5 γ Hornissengift
5 = 5 γ Hornissengift und Cholinesterase nach 60 Minuten
6 = 5 γ Hornissengift, Cholinesterase und Eserin nach 60 Min.

Die Ansätze:
1 ccm Hornissengift 1:10000,
1 ccm einer 1:50 Verdünnung der Stromata-Suspension und
1 ccm NaCl-Lösung 0,85%
sowie
1 ccm Hornissengift 1:10000,
1 ccm einer 1:50 Verdünnung der Stromata-Suspension und
1 ccm Eserin 1:1000000
wurden bei 37°C zusammen in den Thermostaten gestellt. Nach 30 und 60 Minuten wurden jeweils 0,6 ccm entnommen und mit 1,4 ccm NaCl-Lösung 0,85% verdünnt. Zum Vergleich wurde mit Azetylcholin $1:10^5$ der gleiche Versuch angesetzt.

Sowohl Azetylcholin als auch der Wirkstoff des Hornissengiftes wurden binnen 60 Minuten durch Cholinesterase vollständig verseift; die Lösungen waren dann am Mäusedarm unwirksam. Die Hemmung der Cholinesterase durch Eserin war in beiden Fällen zwar nicht vollständig, aber doch sehr deutlich. Im Vorversuch zeigte Eserin für sich allein keine Wirkung auf den Mäusedarm.

6. Einwirkung von Hornissengift und Azetylcholin auf den atropinisierten Mäusedarm

Es sollte festgestellt werden, wie weit der durch Atropin gelähmte Darm durch Hornissengift und Azetylcholin noch kontraktionsfähig ist. Zunächst wurde seine Empfindlichkeit gegen Hornissengift und Azetylcholin geprüft, dann ließen wir 0,1 γ Atropin ungefähr 3 Minuten einwirken und gaben schließlich 0,5 γ Azetylcholin, bezw. 5 γ Hornissengift. 0,1 γ Atropin hemmte sowohl die Hornissengift- als auch die Azetylcholinwirkung praktisch vollständig.

Derselbe Versuch wurde mit höheren Dosen durchgeführt (vgl.Abb.11). Aus Abbildung 11 geht hervor, daß die 3 Minuten lange Einwirkung von Atropin den Effekt des nachfolgenden Azetylcholins stark unterdrückt, während durch entsprechende Dosen Hornissengift noch immer eine, wenn auch geringfügige Darmwirkung zustande kommt. Die Hornissengiftwirkung ist also nicht allein durch Histamin und Azetyl-

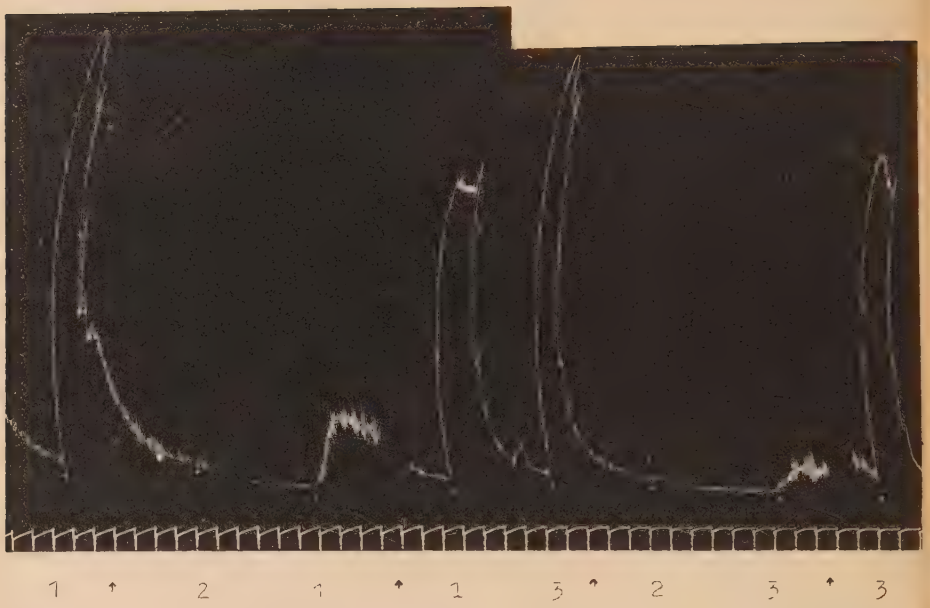


Abb.11: Hornissengift und Azetylcholin am atropinisierten Mäusedarm
1 = 100 γ Hornissengift
2 = 1 γ Atropin
3 = 10 γ Azetylcholin
↑ = Spülung

cholin bedingt, wie auch aus den Versuchen am mit Atropin und Avil behandelten Meerschweinchendarm hervorgeht.

D. Versuche mit Wespengift

Wespengift am atropinisierten Mäusedarm

Bereits SCHMITT beobachtete, daß die am Meerschweinchendarm durch Wespengift hervorgerufene Kontraktion bei der Atropinisierung unverändert bleibt. Da aber nach unseren Untersuchungen Azetylcholin im Hornissengift sicher vorhanden ist, wurde der Versuch mit Wespengift am Mäusedarm wiederholt. Nach 4 Minuten langer Einwirkung

von 0,1γ Atropin ruft 100γ Wespengift eine ungefähr gleich große Kontraktion wie am nicht vorbehandelten Darm hervor, während der hohe Ausschlag des Azetylcholins beinahe ganz gehemmt wird.

III. Besprechung

a) Versuche mit Bienengift

Bei unseren Versuchen erwies sich Bienen-Pikratgift im Vergleich zu der chromatographisch gewonnenen Fraktion I als wesentlich darmwirksamer. Tachyphylaxie gegen Fraktion I wurde zwar ebenfalls beobachtet; sie ist jedoch viel schwächer als die gegen gereinigtes Gift. Inzwischen gelang es HABERMANN[1] aus Fraktion II von Bienengift die Phospholipase A zu isolieren und anzureichern. Testversuche am isolierten Meerschweinchendarm ergaben bereits nach der ersten Darmkontraktion eine sehr starke Tachyphylaxie (HABERMANN[1]). Somit scheint der wesentliche Faktor der tachyphylaktischen Wirkung des Bienengiftes gefunden zu sein.

Daß Histamin nicht als alleinige Ursache der Darmwirksamkeit des Bienengiftes anzusehen ist, wurde schon von ACKERMANN und MAUER beschrieben. Sie konnten mit hohen Dosen Antergan die Bienengiftkontraktion am Meerschweinchendarm aufheben. Die sicher histaminfreie Fraktion I ließ sich in unseren Versuchen durch Avil nicht hemmen. Höhere Avilkonzentrationen ergaben eine partielle Hemmung sowohl von Fraktion I als auch von Azetylcholin. Bienengift enthält also mindestens 3 darmwirksame Faktoren: das altbekannte Histamin, Fraktion I und die Phospholipase-Fraktion.

Lysocithin kommt nach SARTORIUS als Ursache für die ausgeprägte Bienengiftkontraktion nicht in Frage. Auch bei unseren Versuchen war eine Tonussenkung zu beobachten; daneben war allerdings auch eine anfängliche Kontraktion zum Teil recht deutlich. Es ist denkbar, daß man durch von der Serosaseite an den Darm gebrachtes Lysocithin nicht die Effekte von Phospholipase A reproduzieren kann, welche, wenn überhaupt, zur Bildung von Lysocithin innerhalb des Organes selbst führt.

Das Vorkommen eines cholinergischen Faktors im Bienengift wurde von mehreren Autoren verneint. Im Gegensatz zu ACKERMANN und MAUER und SARTORIUS konnten wir niedrige Fraktion-I-Kurven mit Atropin total hemmen. Allerdings waren hohe Fraktion-I-Dosen durch Atropin nicht aufhebbar. Dies spricht dafür, daß bei der Wirkung sehr kleiner Fraktion-I-Dosen der Parasympathikus wesentlich beteiligt ist, während höhere Dosen wohl vorwiegend direkt auf die Muskulatur wirken.

Die von SCHLÖGL beschriebene teilweise Hemmung der Bienengiftwirkung am isolierten Meerschweinchendarm durch Vorbehandlung mit Thrombocid konnte bei unseren Versuchen nicht beobachtet werden. Weder nachträgliche Gaben, noch Vorbehandlung mit Thrombocid konnten eine signifikante Hemmung der Bienengiftwirkung herbeiführen.

b) Versuche mit Hornissengift

Unseren Versuchen über das Hornissengift waren die von HABERMANN[1] und ABRAHAMS vorausgegangen; Histamin war am Blutdruck der Katze, ein cholinergischer Faktor an Herz- und Skelettmuskulatur nachgewiesen worden.

Bei unseren eigenen Versuchen erwies sich Hornissengift als sehr darmwirksam (Endkonzentration 1:20000000). Tachyphylaxie wurde aber im Gegensatz zum Bienengift nicht beobachtet.

Eine Differenzierung der nach HABERMANN[1] und ABRAHAMS zu erwartenden azetylcholin- und histaminartigen Substanzen wurde auf verschiedene Weise versucht. Am isolierten Mäusedarm, der bekanntlich gegen Histamin nur sehr wenig empfindlich ist, wirkte Hornissengift nur 10 bis 20 mal schwächer als reines Azetylcholin. Jedoch ist dies ein Maximalwert. Als wir nämlich Atropin zusetzten, wurde Hornissengift geringer abgeschwächt als Azetylcholin.

Das Vorliegen eines Cholinesters konnten wir durch Verseifungsversuche wahrscheinlich machen. Gegen Alkali war die am Mäusedarm wirksame Komponente des Hornissengiftes sehr empfindlich, gegen Säure war sie nur wenig stabiler als Azetylcholin.

Beweiskräftiger erscheinen die Experimente mit Cholinesterase von Erythrozytenstromata. Durch stark verdünnte derartige Suspensionen ließen sich Azetylcholin und Hornissengift annähernd gleichmäßig inaktivieren. Dieser Prozeß wurde durch den bekannten Cholinesterasehemmer Eserin verlangsamt. Damit ist das Vorliegen eines Cholinesters, wobei in erster Linie an Azetylcholin zu denken ist, im Einklang mit den Versuchen von HABERMANN[1] und ABRAHAMS sehr wahrscheinlich gemacht.

Zur Bestimmung der histaminartigen Wirkung diente der atropinisierte Meerschweinchendarm. Es wurde darauf geachtet, daß die der Tyrodelösung zugefügte Atropinmenge die zu erwartenden Azetylcholineffekte aufhob, ohne die von Histamin allzusehr abzuschwächen. Verglich man an solchen Darmpräparaten Histamin und Hornissengift, so ergab sich ein Aktivitätsverhältnis wie 100:1. Aber auch diese Relation dürfte zu Gunsten des Hornissengiftes etwas zu hoch gegriffen sein, da bei gleichzeitiger Applikation von Atropin und Antihistaminikum noch eine Restkontraktion bestehen blieb.

c) Versuche mit Wespengift

Nachdem sich im Hornissengift sicher ein cholinergischer Faktor nachweisen ließ, wurden die älteren Versuche von SCHMITT zum Nachweis von Azetylcholin im Wespengift am isolierten Mäusedarm nachgeprüft. Auch wir konnten aber kein Azetylcholin im Wespengift nachweisen, sodaß Hornissengift bisher das einzige bekannte Insektengift darstellt, welches nebeneinander Azetylcholin, 5-Oxytryptamin und Histamin enthält.

IV. Zusammenfassung

Es wird über Versuche am isolierten Meerschweinchen- und Mäusedünndarm berichtet.

1. Bienengift erzeugt eine wesentlich stärkere Tachyphylaxie als seine Fraktion I. Diese Fraktion wird durch das Antihistaminikum Avil erst in Dosen beeinflußt, welche bereits die Azetylcholinwirkung verändern. Atropin hemmt dagegen kleine Fraktion-I-Dosen bereits in sehr kleinen, die Histaminwirkung noch nicht beeinflussenden Konzentrationen, doch sind hohe Fraktion-I-Konzentrationen selbst bei entsprechender Steigerung der Atropindosis nicht total hemmbar. Papaverin und Novocain hemmen die Darmwirkung von Bienengift und Fraktion I stark.

2. Hornissengift enthält mindestens drei darmwirksame Substanzen: Histamin, einen Cholinester und 5-Oxytryptamin. Am atropinisierten Meerschweinchendarm ist es hundertmal weniger wirksam als Histamin, doch dürfte der Histamingehalt etwas unter 1% liegen, da auch bei gleichzeitiger Einwirkung von Atropin und einem Antihistaminikum noch eine Restkontraktion besteht. Am isolierten Mäusedarm entsprechen 100 Teile getrocknetes Hornissengift 5-10 Teilen Azetylcholin. Der wirkliche Azetylcholingehalt dürfte aber etwas geringer sein, da bei Anwendung höherer Dosen trotz Atropinisierung eine Restkontraktion bestehen bleibt. Verseifungsversuche mit Säure, Lauge und Cholinesterasepräparaten bestätigten den cholinesterartigen Charakter der darmwirksamsten Komponente.

3. Im Wespengift konnte kein cholinergischer Stoff nachgewiesen werden.

Herrn Privatdozenten Dr. E. Habermann möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Dr. Neumann erlaube ich mir für sein freundliches Entgegenkommen und für die Übernahme des Korreferates Dank zu sagen.

V. Literatur

Abrahams,G.: Inaug.Diss.Würzburg 1955

Ackermann,D.u.H.Mauer: Pflüger Arch.247,623(1944)

Essex,H.E.,J.Markowitz u.F.C.Mann:Am.J.Physiol.94,201 (1930)

Feldberg,W.,H.F.Holden u.C.H.Kellaway:J.Physiol.94,232 (1938)

Feldberg,W.u.C.H.Kellaway: Australien J.Exp.Biol.Med.Sci.15,461 (1937)

Fischer,F.G.u.W.P.Neumann: Biochem.Zschr.324,447 (1953)

Greff,K.: Arch.exper.Path.u.Pharmakol.216,108 (1953)

Habermann,E.(3): Arch.exper.Path.u.Pharmakol.218,108 (1953)

Habermann,E.(2): Inaug.Diss.Würzburg 1951

Habermann,E.(1): Unveröffentl.Versuche

Jaques,R.u.M.Schachter: Brit.J.Pharmacol.9,53 (1954)

Magistris,H.: Biochem.Zschr.210,85 (1929)

Muralt,v.: Prakt.Physiologie,Springerverlag Berlin-Heidelberg 1948

Neumann,W.u.E.Habermann: Arch.exper.Path.Pharakol.222,367 (1954)

Neumann,W.u.E.Habermann u.G.Amend: Naturwissenschaften 39,286 (1952)

Reinert,M.: Festschrift E.Barell, Basel 1936, 407

Richter,R.: Arch.exper.Path.u.Pharmakol.189,172 (1938)

Salzmann,G.: Inaug.Diss.Würzburg 1953

Sartorius,H.: Inaug.Diss.Würzburg 1950

Schachter,M.u.Thain,E.M.: Brit.J.Pharmacol.9,352 (1954)

Schaumann,O.: Arch.exper.Path.u.Pharmakol.196,109 (1940)

Schlögl,W.: Inaug.Diss.Würzburg 1953

Schmitt,R.: Inaug.Diss.Würzburg 1951

Tetsch,C.u.K.Wolff Biochem.Zschr.288,126 (1936)

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 22. August 1928 als Sohn des Arztes Dr. Felix Albl und seiner Ehefrau Marianne, geb. Kern, in Rossbach/ Sudetenland geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1939 in die Oberschule in Saaz ein. Im März 1944 wurde ich als Marinehelfer eingezogen und ein Jahr später schwerkriegsbeschädigt entlassen. Die Reifeprüfung habe ich am Realgymnasium in Pforzheim im Juni 1949 abgelegt.

Seit Wintersemester 1949/50 studierte ich in Würzburg Medizin, wo ich im Februar 1956 mein Studium mit dem Staatsexamen abschloß. Anschließend war ich zwei Monate als Pflichtassistent am Pharmakologischen Institut tätig. Seit Anfang Mai arbeite ich in der Kinderklinik.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Felix Albl

RUDOLF BAENR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG KOLOFFSTEINSTR. 3